

## ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ–ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ТОКСИЧНОСТЬ ЗАГРЯЗНЕННОГО НЕФТЬЮ ЧЕРНОЗЕМА

©2013 М.Д. Бакаева<sup>1</sup>, О.Н. Логинов<sup>1</sup>, О.С. Смолова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>2</sup>ООО «ЮганскНИПИ», г. Нефтеюганск

Поступила 12.06.2013

Исследован процесс детоксикации загрязненного нефтью чернозема после внесения в него окисляющих углеводороды микроорганизмов. Интродукция культуры, состоящей из *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2, оказывала влияние на видовой состав микроскопических грибов и подавляла развитие грибов рода *Fusarium* в загрязненной нефтью почве.

**Ключевые слова:** биопрепарат, нефтяное загрязнение, фитотоксичность, микроскопические грибы.

В регионах, где идет добыча и переработка нефти, загрязнение почв углеводородами является серьезной экологической проблемой. По степени вредного влияния на экосистемы нефть, нефтепродукты и нефтесодержащие промышленные отходы занимают второе место после радиоактивного загрязнения [1]. Естественное восстановление физических, химических и биологических свойств нефтесодержащих почв может длиться несколько десятков лет.

Существенную помощь в решении вопроса очистки территории от нефти могут оказать биологические средства. Микробиологические методы способны дополнять технические способы, а в определенных ситуациях не имеют альтернативы [2]. Преимуществом биологических способов обезвреживания является высокая степень утилизации загрязнителя, снижение антропогенной нагрузки на нарушенную экосистему за счет использования естественных природных ресурсов [3-4]. Поэтому, биологические методы очистки экономически значительно выгоднее, хотя их применение и ограничено весенне-летним периодом.

Биодеградация углеводородов нефти природными микробными популяциями представляет один из основных механизмов, с помощью которого нефть может быть деградирована или трансформирована в окружающей среде. Ряд современных технологий биологической очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами предусматривает введение экзогенных микробов или активизацию эндемичной (почвенной) микробиоты [4].

Восстановление растительных сообществ на месте нефтеразлива является обязательным завершающим этапом любой технологической схемы реабилитации загрязненных углеводородами земель. Однако даже на этом этапе рекультивации растения могут испытывать негативное влияние накопив-

шихся в почве токсичных соединений, отставать в росте, быть уязвимыми для фитопатогенов. В ряде исследований обнаружена тенденция к накоплению в загрязненной почве фитопатогенных и фитотоксичных микроскопических грибов [5-6]. Основной причиной этого является смещение экологического равновесия в едином взаимосвязанном микробном сообществе почв под воздействием углеводородов. Изменяется как частота встречаемости отдельных видов микромицетов и бактерий, так и соотношение грибного и бактериального компонентов сообщества. Например, было показано, что нефтяное загрязнение почвы приводило к изменению численности бактерий в ризосфере пшеницы и ячменя и меняло структуру их комплекса [7]. После нефтяного загрязнения в торфяно-глеевых почвах Республики Коми менялась численность микроорганизмов разных физиологических групп и структура комплекса микроскопических грибов [8]. Под влиянием загрязнения происходила существенная перестройка комплекса организмов чернозема обыкновенного, изменение структуры доминирования. При этом наблюдалось снижение разнообразия микроскопических грибов и рост разнообразия бактерий [9].

Поэтому поиск микроорганизмов – деструкторов нефти, благоприятно влияющих на состав микробного сообщества и прорастание семян в нефтезагрязненной почве, является актуальной задачей.

Целью данной работы было исследование процесса детоксикации загрязненного нефтью чернозема после интродукции в него окисляющих углеводороды микроорганизмов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента на образцах чернозема выщелоченного. В качестве загрязнителя использована товарная нефть Угутского месторождения (температура начала кипения 85°C, содержание серы 1,1 мас.%) в концентрации 5%, 10% и 15% от веса грунта. Через пять суток после загрязнения грунт был обработан в количестве 5 мл/кг биопрепаратом «Ленойл» с титр 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. В качестве альтерна-

Бакаева Маргарита Дмитриевна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: biolab316@yandex.ru; Логинов Олег Николаевич, д.б.н., проф., заведующий лабораторией, e-mail: biolab316@yandex.ru; Смолова Ольга Сергеевна, ведущий специалист, e-mail: biolab316@yandex.ru

тивы использована бинарная культура микроорганизмов *Pseudomonas sp.* ИБ НД1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД1.2 с титром  $10^9$  КОЕ/мл, выделенная в лаборатории биологически активных веществ Института биологии УНЦ РАН. Почву инкубировали в емкостях по 2 кг при температуре воздуха 18-20°C в течение 90 сут.

Содержание углеводов в грунте определяли гравиметрически. Выделение и количественный учет микроорганизмов проводили по общепринятым методикам на питательных средах: микромицетов – на среде Чапека, деструкторов углеводов – на среде Цукамуры [10]. Длину гиф грибного мицелия в 1 г почвы измеряли в процессе микроскопирования мембранных фильтров, после осаждения на них почвенной взвеси [11]. Идентификацию видов микромицетов проводили по определителям [12-15]. Видовые названия микроскопических грибов уточняли по пополняемым спискам опубликованных видов в базе данных «Species fun-

gorum» ([www.speciesfungorum.org](http://www.speciesfungorum.org)). Фитотоксичность грунта оценивали по всхожести семян кресс-салата, разложенных на его поверхности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение остаточного содержания углеводов в почве через 90 сут инкубации показало, что разложение углеводов протекало неодинаково в разных вариантах опыта (рис. 1). Выявлено положительное влияние интродукции окисляющих углеводов бактерий на деструкцию нефти. Статистически достоверных отличий между почвами с внесением биопрепарата «Ленойл» и бинарной культуры *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2 обнаружено не было. Максимальное остаточное содержание углеводов наблюдалось в контрольных вариантах опыта без дополнительных обработок.

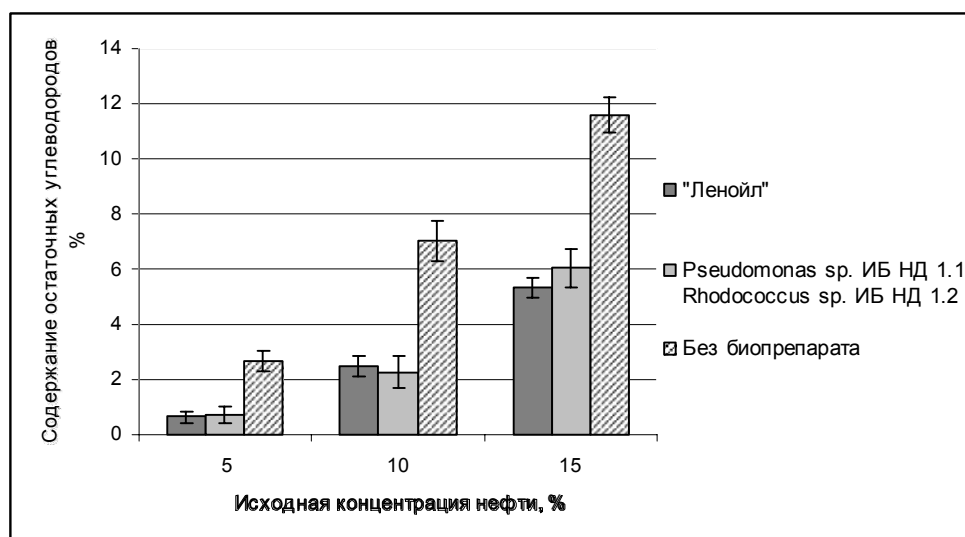


Рис. 1 Содержание остаточных углеводов в почве на 90-е сут опыта

Численность в почве окисляющих углеводов микроорганизмов может служить косвенным показателем активности процесса микробного окисления нефти. Определенная методом посева на твердую питательную среду с дизельным топливом она была выше в вариантах опыта с интродукцией бактерий - деструкторов (табл. 1). Она была чуть ниже

в почве, загрязненной нефтью в концентрации 15%, что, по-видимому, объясняется токсичным действием углеводов. Существенных отличий в численности микроорганизмов между вариантами опытов с использованием разных микроорганизмов - деструкторов выявлено не было.

Таблица 1. Численность окисляющих углеводов микроорганизмов в рекультивированной почве, КОЕ/г

| Микроорганизмы  | Концентрация нефти, %      |                            |                            |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|   | 5                          | 10                         | 15                         |
| Без биопрепарата  | $(8,0 \pm 0,9) \cdot 10^6$ | $(5,0 \pm 0,6) \cdot 10^6$ | $(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$ |
| «Ленойл»  | $(3,1 \pm 0,5) \cdot 10^7$ | $(2,6 \pm 0,7) \cdot 10^8$ | $(4,0 \pm 0,8) \cdot 10^6$ |
| <i>Pseudomonas sp.</i> ИБ НД 1.1 и <i>Rhodococcus sp.</i> ИБ НД 1.2 | $(7,9 \pm 0,3) \cdot 10^8$ | $(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^7$ | $(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$ |

Рекультивация в значительной степени способствовала снижению токсичности загрязненного грунта (рис. 2). Обнаружено, что фитотоксичность загрязненных почв по отношению к семенам кресс-салата после обработки культурой *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2 была ниже,

чем после обработки биопрепаратом «Ленойл». Стимулирующее влияние интродукции изучаемой культуры микроорганизмов на прорастание семян кресс-салата проявлялось в вариантах с разной исходной концентрацией нефти. При 5% и 10% начальном содержании нефти после добавления куль-

туры *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2 количество взойшедших семян было таким же, как на пропитанной водой фильтровальной

бумаге. Многие семена и проростки на загрязненной почве без искусственного введения деструкторов поразились грибным мицелием.

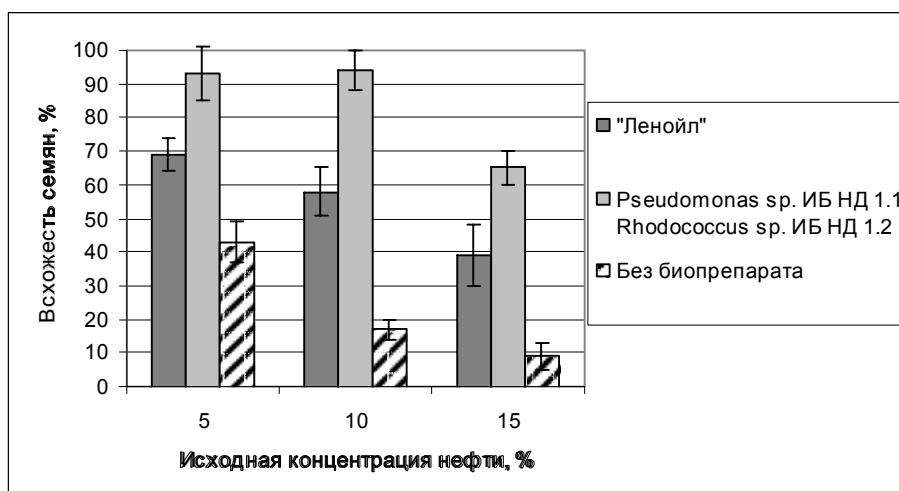


Рис. 2 Всхожесть семян кресс-салата на загрязненной и рекультивированной почве

Поскольку остаточное содержание нефти в вариантах опыта с разными микроорганизмами отличалось несущественно, было предположено, что неблагоприятное влияние загрязненной почвы на семена кресс-салата объяснялось не только присутствием в ней углеводов, но также фитопатогенных или фитотоксичных микромицетов.

При изучении комплекса почвенных микроскопических грибов были использованы такие показатели как длина мицелия в 1 г почвы и его видовой состав. Было обнаружено относительно невысокое

содержание грибного мицелия в незагрязненном грунте –  $27,5 \pm 4,4$  м/г. Нефтяное загрязнение в концентрации 5% и 10% вызывало значительное увеличение этого показателя, тогда как при концентрации 15% этот показатель увеличивался незначительно (табл. 2). Гораздо меньше мицелия обнаруживалось после рекультивации, возможно за счет вытеснения его бактериальной составляющей ценоза. Более выраженное антигрибное влияние оказывала интродукция культуры *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2.

Таблица 2. Длина грибных гиф в загрязненной и рекультивированной почве, м/г

| Микроорганизмы  | Концентрация нефти, % |                  |                |
|---|-----------------------|------------------|----------------|
|   | 5                     | 10               | 15             |
| Без биопрепарата  | $121,5 \pm 7,4$       | $119,1 \pm 21,0$ | $59,3 \pm 9,5$ |
| Ленойл  | $64,0 \pm 6,8$        | $71,3 \pm 4,0$   | $43,0 \pm 3,9$ |
| <i>Pseudomonas sp.</i> ИБ НД 1.1 и <i>Rhodococcus sp.</i> ИБ НД 1.2 . | $22,0 \pm 4,2$        | $28,8 \pm 5,0$   | $16,4 \pm 2,7$ |

Анализ таксономической принадлежности выделенных из незагрязненной почвы грибных изолятов показал доминирование среди них представителей рода *Penicillium*, что является обычным для почв данного типа (рис. 3). Загрязнение почв нефтью, а также их рекультивация приводили к существенным изменениям в комплексе микроскопических грибов чернозема. В частности, в загрязненных почвах возрастала доля грибов, принадлежащих к родам *Fusarium* и *Aspergillus*, что, возможно, связано с наличием у них углеводородокисляющей способности. Из использованных для интродукции микробных культур *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2 в большей степени, чем «Ленойл» влияли на видовой состав почвенных микромицетов, значительно снижая долю представителей рода *Fusarium*. В связи с этим была проверена антагонистическая активность данной культуры по отношению к грибам рода *Fusarium*.

Одновременный посев газона микромицета *Fusarium oxysporum* и внесение культуры бактерий вызывало образование зон, в которых замедлялся рост грибных гиф, радиусом 1,5-2 см. Зоны полного подавления грибного роста не наблюдались. Т.е. культура *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2 обладала фунгистатической активностью.

Таким образом, внесение окисляющей углеводороды культуры *Pseudomonas sp.* ИБ НД 1.1 и *Rhodococcus sp.* ИБ НД 1.2 может подавлять развитие грибов рода *Fusarium* в нефтесодержащей почве. Ее применение может быть целесообразно в том случае, если озеленение загрязненного грунта проводится в один вегетационный сезон с внесением биопрепарата – нефтеселектора. Возможность использования этой культуры в процессе фитомелиорации требует дальнейших исследований.

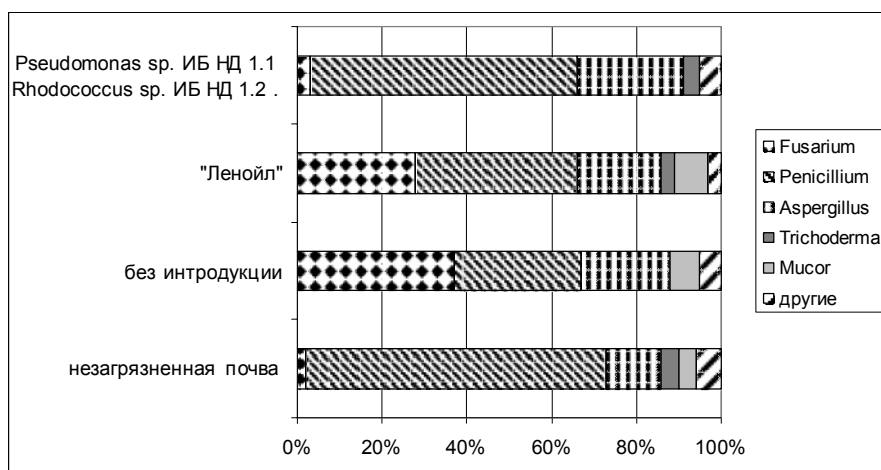


Рис. 3 Соотношение микроскопических грибов, принадлежащих к разным родам в незагрязненной почве и почве, загрязненной нефтью в концентрации 10%

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черняховский Э.Р., Шкидченко А.Н., Юматова О.А., Чушкина З.Ю. Применение различных технологий при ликвидации последствий аварийных разливов нефти, нефтепродуктов и продуктов переработки нефтесодержащих отходов // Проблемы безопасности и чрезвычайных ситуаций. 2004. № 6. С. 18-23.
2. Калужин В.А. Биодegradация нефти // Исследования эколого-географических проблем природопользования для обеспечения территориальной организации и устойчивости развития нефтегазовых регионов России: Теория, методы и практика. Нижневартовск: НГПИ, 2002. С. 229-230.
3. Павлов П.В., Соколова А.С. Проектные решения по рекультивации нефтезагрязненных земель // Нефтяное хозяйство. 2002. № 7. С. 66-67.
4. Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биореккультурация. Микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов. М.: Наука, 2009. 112 с.
5. Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф. Влияние различных способов биоремедиации нефтезагрязненных почв на характеристику комплекса микромицетов // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. № 1. С. 63-68.
6. Марфенина О.Е. Антропогенные изменения комплексов микроскопических грибов в почвах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М: МГУ, 1999. 48 с.
7. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Григориади А.С. Влияние загрязнения почв нефтью на физиологические показатели растений и ризосферную микробиоту // Агрохимия. 2009. № 7. С. 71-81.
8. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., Щемелинина Т.Н., Маркарова М.Ю. Биологическая активность загрязненных нефтью и рекультивируемых торфяно-глеевых почв Республики Коми // Агрохимия. 2008. № 8. С. 68-75.
9. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Велигонова Н.В., Патрушева Е.В., Азнаурьян Д.К., Вальков В.Ф. Изменение комплекса почвенных микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного нефтью и нефтепродуктами // Агрохимия. 2007. № 12. С. 44-48.
10. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр Академия, 2005. 608 с.
11. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
12. Билал В.И. Фузари. Киев: Наукова думка, 1977. 442 с.
13. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Л: Наука, 1967. 302 с.
14. Пидопличко Н.М. Пеницилли. Киев: Наукова думка, 1972. 150 с.
15. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. Florida, 2000. 411 p.

## INFLUENCE OF MICROORGANISMS–DESTRUCTORS OF HYDROCARBONS ON TOXICITY OF THE OIL POLLUTED CHERNOZEM

©2013 M.D. Bakaeva<sup>1</sup>, O.N. Loginov<sup>1</sup>, O.S. Smolova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

<sup>2</sup>JSC YuganskNIPI, Nefteyugansk

Process of a detoxication of the oil polluted chernozem after an addition of hydrocarbons oxidizing microorganisms in it is investigated. Introduction of the culture consisting of *Pseudomonas sp.* IB ND1.1 and *Rhodococcus sp.* IB ND 1.2 had impact on specific structure of microscopic fungi and suppressed development of fungi belonging to the genus *Fusarium* in the oil polluted soil.

**Keywords:** biological product, oil pollution, phytotoxicity, microscopic fungi.

Margarita Bakaeva, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: biolab316@yandex.ru; Oleg Loginov, Doctor of Biology, Professor, head of laboratory, e-mail: biolab316@yandex.ru; Olga Smolova, leading specialist, e-mail: biolab316@yandex.ru